

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

## PATENTSCHRIFT

B1

ISSN 0433-6461 (11) 1581 09

Int.Cl.<sup>3</sup> 3(51) C 12 N 9/99

## AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2291 332

(22) 10.04.81

(44) 29.12.82

- (71) siehe (72)  
 (72) FISCHER, GUNTER, DR. DIPL.-CHEM.; DEMUTH, HANS-ULRICH, DR. DIPL.-BIOCHEM.;  
 BARTH, ALFRED, PROF. DR. DIPL.-CHEM.; DD;  
 (73) siehe (72)  
 (74) MARTIN-LUTHER-UNIVERSITAET HALLE-WITTENBERG, BFN/S, 4020 HALLE(S.), DOMPLATZ 4

## (54) VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITAET VON PEPTIDHYDROLASEN

(57) Das erfundungsgemäße Verfahren dient zur Hemmung unerwünschter peptidhydrolytischer Aktivitäten bei labordiagnostischen, medizinischen und lebensmitteltechnischen Gegebenheiten oder Verfahren. Ziel der Erfindung ist ein leicht anwendbares Verfahren zur spezifischen Hemmung der Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxyl-Gruppen im Substrat benötigen und katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten. Im erfundungsgemäßen Verfahren werden Substanzen mit der Formel zur Hemmung der katalytischen Aktivität verwendet. Dabei bedeutet R einen α-Aminosäure-, N-geschützten α-Aminosäure- oder Peptidylrest, dessen Struktur vom Zielenzym des betreffenden Inhibitors abhängt. Diese Struktur muß so beschaffen sein, daß die Peptidhydrolase eine Substanz mit einer -CONH-Gruppe anstelle des -CO-NH-OCO-Restes in der Formel als Substrat umsetzt. R<sub>1</sub> entspricht einem Phenylrest, der in ortho-, meta oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in Kombination dieser Stellung zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>O, trägt. Formel -

BEST COPY AVAILABLE

-1-

### Verfahren zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Peptidhydrolasen

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der katalytischen Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten. Solche Peptidhydrolasen können unter labordiagnostischen, medizinischen und lebensmitteltechnischen Gegebenheiten oder bei Verfahren auf diesen Gebieten mit unerwünscht hoher Aktivität auftreten.

Inhibitoren von Peptidhydrolasen werden als Feinchemikalien in der Biochemie, Molekularbiologie, Medizin, biochemischen Genetik, Pharmazie, sowie Lebensmittelwissenschaft und -industrie benötigt..

#### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher gelingt die gezielte Hemmung einiger Peptidhydrolasen insbesondere durch die Isolierung proteinartiger Substanzen aus pflanzlichen und tierischen Organismen (Ann. Rev. Biochem. 49, 593-626 (1980)) oder durch synthetisch zugängliche Substanzen, vorzugsweise aus der Klasse der Peptidaldehyde, der Peptidyl-halogenmethylketone, der Azapeptide und der Peptidyl-N-nitrosoamide (Methods in Enzymology, Bd. XLVI, Academic Press, New York 1977, S. 3-240).

In einem typischen Verfahren zur Gewinnung eines natürlich vorkommenden Inhibitors für die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und die Gruppe der Kininogenasen wird inhibitorhaltiges Material aus Helix pomatia isoliert und über aufwendige Zentrifugationsschritte und säulenchromatographische Verfahren zum aktiven Inhibitor gereinigt (CH - PS Nr. 590063).

Von den synthetisch darstellbaren Inhibitoren ergeben sich für Peptid-

229133 2

aldehyde und Azapeptide, insbesondere für solche, die mehrfunktionelle Aminosäuren enthalten, langwierige Darstellungsverfahren mit niedrigen Ausbeuten.

Peptidyl-N-nitrosoamide enthalten die als mutagen bekannte N-Nitrosoamidgruppe, wodurch eine Anwendung weitgehend eingeschränkt wird.

Die weiterhin beschriebenen Peptidyl-halogenmethylketone enthalten als  $\alpha$ -Halocarbonylverbindungen eine für Nucleophile, wie sie in biologischen Flüssigkeiten in hohen Konzentrationen auftreten können, leicht angreifbar Halogenmethylgruppe. Die entstehenden Reaktionsprodukte besitzen nicht mehr die typischen Inhibitoreigenschaften der Peptidyl-halogenmethylketone, so daß unter solchen Bedingungen der Gehalt an aktiven Inhibitor am Wirkungsort schnell absinkt (Amer. Rev. Resp. Dis. 121, 381-387 (1980)).

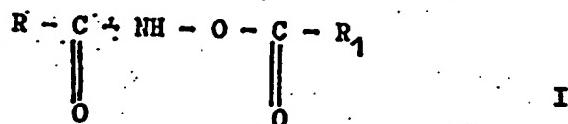
Außerdem hat sich gezeigt, daß Peptidyl-halogenmethylketone mit einer oder mehreren freien Aminofunktionen im Molekül, deren Zielenzyme damit als Aminopeptidasen gekennzeichnet sind, zusätzlich durch Cyclisierungsreaktionen destabilisiert werden, was ihre Verwendbarkeit weitgehend ausschließt.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein leicht anwendbares, unter Anwendungsbedingungen genügend robustes Verfahren zur spezifischen Hemmung der katalytischen Aktivität solcher Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freien Carboxylgruppen im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren unter Anwendung stabiler und synthetisch leicht darstellbarer Inhibitoren hoher Spezifität für eine Anzahl von Peptidhydrolasen zur Verfügung zu stellen. Erfindungsgemäß erfüllt ein Verfahren unter Verwendung von Substanzen der allgemeinen Formel



diese Forderungen.

In der Formel bedeutet R einen  $\alpha$ -Aminosäure-, zum Beispiel  $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-}$  für L-Alanin, einen N-geschützten  $\alpha$ -Aminosäure- oder einen Peptidylrest, dessen genaue Struktur vom Zielenzym für den betreffenden Inhibitor abhängt. Diese Struktur muß so beschaffen sein, daß die betreffende Peptidhydrolase eine Substanz mit einer  $-\text{CO-NH-}$  Gruppe anstelle des  $-\text{CO-NHCOO-}$  Restes in Formel I als Substrat umsetzt.

R<sub>1</sub> steht für einen Phonylrest, der in ortho-, meta- oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in einer Kombination dieser Stellungen zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>O trägt.

Bei der Einwirkung der wässrigen Lösung eines Stoffes der Formel I mit einem solchen Rest R der von der betreffenden Peptidhydrolase als Substrat erkannt wird, auf die im biologischen Material enthaltene oder die isolierte Peptidhydrolase unter äußeren Bedingungen, bei denen das Enzym üblicherweise seine katalytische Wirkung entfaltet, kommt es zu einer zeitabhängigen irreversiblen Hemmung der Enzymaktivität, die unter anderem von der Enzymkonzentration, der Inhibitorkonzentration und der Struktur der Reste R<sub>1</sub> und R abhängt.

Das erfindungsgemäße Verfahren entfaltet dabei seine Wirkung derart, daß nach Bindung der Inhibitoren an das Zielenzym ein Anion, im Falle der Struktur I also R-COO<sup>-</sup>, abgespalten wird und das verbleibende hochreaktive Intermediat vom Typ R-CONH<sup>+</sup> selbst oder nach schnellen Umwandlungen solche chemische Gruppen im Enzym blockiert, die für das katalytische Geschehen bedeutend sind. Diesen Typ der Hemmung eines Enzyms bezeichnet man als enzymaktivierte Inhibition. Ein wichtiger Vorteil des Verfahrens unter Verwendung von Hemmstoffen auf dieser Basis besteht darin, daß die chemisch hochreaktive Gruppe des Inhibitors sich erst nach der Einwirkung auf das Zielenzym herausbildet, so daß unspezifische Hemmeffekte auf andere Peptidhydrolasen und chemische Nebenreaktionen weitgehend vermieden werden. Inhibitoren mit der Grundstruktur I zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus. Eine Variation dieser Spezifität zur Hemmung der verschiedenen Peptidhydrolasen mit katalytisch wirksamen Serin- oder Cysteinresten im Molekül gelingt in der Regel schon dadurch, daß zum Beispiel bei konstanten Rest R<sub>1</sub> (4-Nitrophenyl) der Rest R der Spezifität des Enzyms angepaßt wird. Die dazu nötigen synthetischen Operationen entsprechen den üblichen Methoden der Peptidchemie.

Gemische von Peptidhydrolasen lassen sich durch Gemische der für diese Hydrolasen spezifischen Inhibitoren hemmen.

Die erfindungsgemäßen Inhibitoren können auch als Salze zum Beispiel Hydrochlorid, Tosylat vorliegen.

#### Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an fünf Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

#### Beispiel 1

Die in den Beispielen 2 bis 5 verwendeten Inhibitoren werden aus den entsprechenden Peptidylhydroxamsäuren nach folgender allgemeinen Vorschrift hergestellt.

2,67 mMol N-geschützte Peptidylhydroxamsäure werden in 5 ml Wasser unter Rühren mit 3 mMol NaOH und 2,7 mMol 4-Nitrobenzoylchlorid, gelöst in 5 ml Tetrahydrofuran, bei 5°C versetzt. Man lässt noch eine Stunde bei Raumtemperatur stehen und gießt die Mischung anschließend in 50 bis 100 ml Eiswasser. Der ausfallende Niederschlag wird abgesaugt und über KOH getrocknet. Die Peptidyl-N(4-Nitrobenzoyloxo)amide werden in der Regel aus Ethylacetat umkristallisiert.

#### Beispiel 2

Dipeptidylpeptidase IV wurde unter Verwendung von Ala-Pro-N-(4-Nitrobenzoyloxo)amid · HCl irreversibel gehemmt.

Die Reaktionslösung enthielt  $1,1 \cdot 10^{-3}$  mol/l Inhibitor, 0,037 mol/l Natriumphosphatpuffer (pH 7,6), KCl um die Ionenstärke auf 0,125 einzustellen und 0,3 µg Dipeptidylpeptidase IV. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms zur Inhibitorlösung gestartet und bei 30°C durchgeführt.

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 2,7 ml.

Im zeitlichen Abstand von 10 Minuten wurden Proben von 0,2 ml dem Reaktionsansatz entnommen und in einem Testansatz die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitgelaufenen Blindwert ohne Inhibitor vermessen. Nach 20 Minuten war die Aktivität der Dipeptidylpeptidase auf 50% der Ausgangsaktivität gesunken, nach 120 Minuten war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität enthielt 0,037 mol/l

Natriumphosphat bei pH 7,6 und 2,0.  $10^{-3}$  Ala-Pro-4-nitroanilid. Die Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch anhand der Extinktionszunahme durch freigesetztes 4-Nitroanilin bei 390 nm ermittelt. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2,7 ml. Gemessen wurde bei 30°C.

#### Beispiel 3

Im Humanurin enthaltene Dipeptidylpeptidase IV wurde unter Verwendung von Ala-Pro-N-(4-Nitro-benzoyloxo)amid . HCl irreversibel inhibiert. Zu dem im Beispiel 1 angegebenen Reaktionsansatz wurde anstelle eines Teils der Pufferlösung 0,5 ml Humanurin gegeben. Die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit wurde analog Beispiel 1 bestimmt. Nach 20 Minuten Reaktionszeit betrug die restliche Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV noch 50%, nach 120 Minuten war keine Aktivität mehr nachweisbar.

#### Beispiel 4

Thermitase (eine mikrobielle Protease aus Thermoactinomyces vulgaris) wurde unter Verwendung von BOC-Ala-N-(4-nitrobenzoyloxo)amid irreversibel inaktiviert.

Die Reaktionslösung enthielt  $4,2 \cdot 10^{-5}$  mol/l Inhibitor und 0,033 mol/l Tris-Puffer (pH 7,5). Der Thermitasegehalt betrug  $1,4 \cdot 10^{-6}$  mol/l; der Reaktionsansatz 1,5 ml wurde auf 30°C gehalten. Im zeitlichen Abstand von 2 Minuten wurden Proben von je 0,1 ml entnommen und im Testansatz auf die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitlaufenden Blindwert ohne Inhibitorzusatz vermessen.

Nach 2 Minuten betrug die Aktivität der Thermitase noch ca 50% des Ausgangswertes, nach 15 Minuten war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität enthielt 0,033 mol/l Tris-Puffer pH 7,5 (30°C) und  $5,3 \cdot 10^{-4}$  mol/l BOC-Ala-Ala-4-nitroanilid. Die Enzymaktivität wurde durch einen Extinktionsanstieg bei 390nm ermittelt.

#### Beispiel 5

Elastase aus Rinderpankreas wurde unter Verwendung von BOC-Ala-Pro-Ala-N-(4-Nitrobenzoyloxo)amid irreversibel inhibiert. Die Reaktionslösung enthielt  $2,8 \cdot 10^{-4}$  mol/l Inhibitor, 0,033 mol/l Tris-Puffer (pH 8,0)

229133 2

6

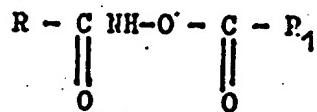
und 0,077 mol/l NaCl.

Der Elastasegehalt betrug  $5,3 \cdot 10^{-6}$  mol/l, der Reaktionsansatz von 1,5 ml wurde bei 30°C gehalten. Im zeitlichen Abstand von 5 bis 10 Minuten wurden Proben von je 0,1 ml entnommen und im Testansatz auf die verbliebene Enzymaktivität im Vergleich zu einem mitgelaufenen Blindwert ohne Inhibitorzusatz vermessen. Nach 18 Minuten betrug die Aktivität der Elastase noch 50% des Ausgangswertes und war nach 120 Minuten mehr nachweisbar.

Der Testansatz enthielt 0,033 mol/l Natriumphosphat pH 7,0 und  $2,4 \cdot 10^{-4}$  mol/l BOC-Ala-4-nitrophenylester. Die Messung der Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch bei 405 nm anhand des freigesetzten 4-Nitrophenols durchgeführt.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Aktivität von solchen Peptidhydrolasen, die während ihrer Funktion keine C-terminal freie Carboxylgruppe im Substrat benötigen und insbesondere katalytisch wirksame Serin- oder Cysteinreste enthalten, gekennzeichnet dadurch, daß Substanzen der allgemeinen Formel I



angewandt werden; worin R eine  $\alpha$ -Aminosäure, eine N-geschützte  $\alpha$ -Aminosäure oder einen Peptidylrest, dessen genaue Struktur vom Zielenzym für den betreffenden Inhibitor abhängt, bedeuten, wobei diese Struktur so beschaffen ist, daß die betreffende Peptidhydrolase eine Substanz mit einer  $-\text{CONH-}$  Gruppe anstelle der  $-\text{CONH-OCO-}$  Gruppe in Formel I als Substrat umsetzt und  $R_1$  für einen Phenylrest, der in ortho-, meta- oder para-Stellung zur Carbonylgruppe keinen, einen oder in einer Kombination dieser Stellungen zwei Substituenten, vorzugsweise F, Cl, Br,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{O}$  trägt, steht, wobei der aktive Hemmstoff ein enzymaktiviertes Intermediat vom Nitrentyp darstellt.

2. Verfahren zur Hemmung von Peptidhydrolasen gekennzeichnet durch die Anwendung von Mitteln, die einen Inhibitor gemäß dem Verfahren in Anspruch 1 enthalten.